



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

| | | |
|--|-----------|---|
| <p>(51) 国際特許分類7 A61K 45/00, 38/08, 35/00</p> | <p>A1</p> | <p>(11) 国際公開番号 WO00/40268</p> <p>(43) 国際公開日 2000年7月13日(13.07.00)</p> |
| <p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/00002</p> <p>(22) 国際出願日 2000年1月4日(04.01.00)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平11/2971 1999年1月8日(08.01.99) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 帝国臓器製薬株式会社 (TEIKOKU HORMONE MFG. CO., LTD.)[JP/JP] 〒107-8522 東京都港区赤坂二丁目5番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 河野通明(KOHNO, Michiaki)[JP/JP] 〒852-8013 長崎県長崎市梁川町19-1-503 Nagasaki, (JP) 渡邊一石(WATANABE, Kazushi)[JP/JP] 〒852-8053 長崎県長崎市葉山1-8-1-212 Nagasaki, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 小田島平吉, 外(ODAJIMA, Heikichi et al.) 〒107-0052 東京都港区赤坂1丁目9番15号 日本自転車会館 小田島特許事務所 Tokyo, (JP)</p> | | <p>(81) 指定国 AU, CA, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p> |
| <p>(54)Title: ANTITUMOR AGENTS</p> <p>(54)発明の名称 抗腫瘍剤</p> <p>(57) Abstract When an antitumor agent acting on microtubule is used together with an ERK MAP kinase cascade blocking agent, the antitumor effect of the agent acting on microtubule can be remarkably potentiated. Namely, a combination of the agent acting on microtubule with the ERK MAP kinase cascade blocking agent is useful as an excellent antitumor agent with a remarkable efficacy.</p> | | |

(57)要約

抗腫瘍作用を示す微小管作用剤とERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤を組み合わせると微小管作用剤の抗腫瘍作用が著しく増強される。従って、微小管作用剤とERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤の組み合わせは非常に効果の優れた抗腫瘍剤として有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

| | | | | | | | |
|----|--------------|----|---------|----|----------------|----|------------|
| AE | アラブ首長国連邦 | DM | ドミニカ | KZ | カザフスタン | RU | ロシア |
| AG | アンティグア・バーブーダ | DZ | アルジェリア | LC | セントルシア | SD | スーダン |
| AL | アルバニア | EE | エストニア | LI | リヒテンシュタイン | SE | スウェーデン |
| AM | アルメニア | ES | スペイン | LK | スリ・ランカ | SG | シンガポール |
| AT | オーストリア | FI | フィンランド | LR | リベリア | SI | スロヴェニア |
| AU | オーストラリア | FR | フランス | LS | レソト | SK | スロヴァキア |
| AZ | アゼルバイジャン | GA | ガボン | LT | リトアニア | SL | シエラ・レオネ |
| BA | ボスニア・ヘルツェゴビナ | GB | 英国 | LU | ルクセンブルグ | SN | セネガル |
| BB | バルバドス | GD | グレナダ | LV | ラトヴィア | SZ | スワジランド |
| BE | ベルギー | GE | グルジア | MA | モロッコ | TD | チャード |
| BF | ブルキナ・ファソ | GH | ガーナ | MC | モナコ | TG | トーゴ |
| BG | ブルガリア | GM | ガンビア | MD | モルドヴァ | TJ | タジキスタン |
| BJ | ベナン | GN | ギニア | MG | マダガスカル | TM | トルクメニスタン |
| BR | ブラジル | CR | ギリシャ | MK | マケドニア旧ユーゴスラヴィア | TR | トルコ |
| BY | ベラルーシ | CW | ギニア・ビサウ | | 共和国 | TT | トリニダード・トバゴ |
| CA | カナダ | HR | クロアチア | ML | マリ | TZ | タンザニア |
| CF | 中央アフリカ | HU | ハンガリー | MN | モンゴル | UA | ウクライナ |
| CG | コンゴ | ID | インドネシア | MR | モーリタニア | UG | ウガンダ |
| CH | スイス | IE | アイルランド | MW | マラウイ | US | 米国 |
| CI | コートジボアール | IL | イスラエル | MX | メキシコ | UZ | ウズベキスタン |
| CM | カメルーン | IN | インド | MZ | モザンビーク | VN | ヴェトナム |
| CN | 中国 | IS | アイスランド | NE | ニジェール | YU | ユーゴスラヴィア |
| CR | コスタ・リカ | IT | イタリア | NL | オランダ | ZA | 南アフリカ共和国 |
| CU | キューバ | JP | 日本 | NO | ノールウェー | ZW | ジンバブエ |
| CY | キプロス | KE | ケニア | NZ | ニュー・ジーランド | | |
| CZ | チェコ | KG | キルギスタン | PL | ポーランド | | |
| DE | ドイツ | KP | 北朝鮮 | PT | ポルトガル | | |
| DK | デンマーク | KR | 韓国 | RO | ルーマニア | | |

明 細 書

抗腫瘍剤

技術分野

本発明は、微小管作用剤とERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤の組み合わせを抗腫瘍剤として使用することに関する。

背景技術

微小管は、動物・植物・真菌等の真核生物の細胞に広く存在する直径25 nm前後の管状蛋白繊維で、その機能としては、有糸分裂装置の形成、細胞形態の形成と維持、鞭毛・纖毛運動、細胞内オルガネラの配置、物質輸送、ホルモン分泌、細胞膜の流動性など極めて多岐にわたっている。特に神経細胞においては軸索や樹状突起の主構成分子として存在し、モーター蛋白のレールとして物質の輸送に寄与している。この微小管は、チューブリン・ $\alpha\beta$ ヘテロ2量体が規則正しく重合して形成されており、細胞周期の進行に伴い重合／脱重合による消長を繰り返している。また、これら微小管は微小管結合蛋白質（MAPs、 τ 蛋白）によってもその重合／脱重合が制御されており、その制御機構は主にこれら微小管結合蛋白質を基質とする蛋白質リン酸化酵素（キナーゼ）及び蛋白質脱リン酸化酵素（フォスファターゼ）によって引き起こされるものである。これらのことから、この微小管系に作用する化合物は、細胞分裂阻害など様々な生物活性を示し、抗腫瘍剤をはじめとして、抗カビ剤、駆虫剤、除草剤などとしての幅広い効果が期待される。

微小管作用剤は、その作用部位によって、 β -チューブリンに結合する化合物と微小管結合蛋白に結合する化合物とに別けられ、更に β -チューブリンに結合する化合物は、結合することによりチューブリンの重合

を阻害する化合物と、逆にチューブリンの異常な重合を促進する化合物とに別けられる。この中でも、特にチューブリン重合を阻害する化合物は、直接的に微小管形成を阻害する結果として細胞分裂を抑制するので、増殖期細胞に対して選択的な影響を及ぼすことが期待され、いくつかの化合物については現在抗腫瘍剤として使用され、或いは開発が進められている。

一方、ERK・MAPキナーゼは、真核生物に普遍的に存在するセリン／スレオニンキナーゼであり、それは多様な細胞外刺激に応答した様々な生命現象(細胞増殖、神経細胞分化、細胞運動亢進、卵細胞成熟、など)の誘導において中心的な役割を果たしている。すなわち、様々な細胞増殖・分化因子などが標的細胞表面に存在する各受容体と特異的に結合することを契機として引き起こされる細胞内シグナル伝達反応系において、ERK・MAPキナーゼはまさに中心的な役割を果たしている。

上記細胞内シグナル伝達系(ERK・MAPキナーゼカスケード)において、ERK・MAPキナーゼの上流では幾つかのシグナル分子が機能していることが知られており、その中で最もよく解析されているものとしてはRas、Raf-1、MEKなどがある。具体的には、外界刺激に応答してGTP結合蛋白の一種であるRasが活性化され、次にMAPキナーゼキナーゼキナーゼ(MAPKKK)の一種であるRaf-1(セリン／スレオニンキナーゼ)が活性化される。Raf-1は次に、セリン／スレオニン残基およびチロシン残基のいずれをもリン酸化するという特異な基質特異性を持つMAPキナーゼキナーゼの一種、MEK1/2をリン酸化／活性化する。ここで活性化されたMEK1/2は、不活性型のMAPキナーゼ(ERK1/2)を、そのキナーゼサブドメインVIIとVIIIの間に

存在するThr-Glu-Tyr (T E Y) 配列のT (スレオニン) とY (チロシン) 残基をリン酸化することによって、活性型のMAPキナーゼに変える。このようにして活性化されたMAPキナーゼ (ERK1/2) は細胞質から核内に移行し、そこで幾つかの転写因子のリン酸化／活性化などを誘導することで、最終的な生理応答の発現につながると考えられている。ERK・MAPキナーゼカスケードは上述のように様々な生理応答の発現に関与していることが知られており、特にそれは細胞増殖促進において必須の役割を果たすことが明らかにされている。すなわち、ERK・MAPキナーゼカスケードを遮断することで、細胞増殖を抑制をすることが期待される。

しかしながら、上述の微小管に作用する化合物とERK・MAPキナーゼカスケードを遮断する化合物を組み合わせ、抗腫瘍剤として用いることの有効性に関してはこれまで全く知られていない。

発明の開示

本発明者らは、微小管作用剤の抗腫瘍作用について種々研究を重ねた結果、今回、抗腫瘍作用を示す微小管作用剤に、ERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤を組み合わせ使用すると、全く意外にも、微小管作用剤の抗腫瘍作用が著しく増強されることを見出した。

しかして、本発明によれば、微小管作用剤とERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤を、同時に又は所定の時間間隔で別々に投与して腫瘍を処置するための微小管作用剤とERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤の組み合わせが提供される。

また、本発明によれば、ERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤と組み合わせ使用するための微小管作用剤を有効成分として含有する抗腫瘍剤

が提供される。

また、本発明によれば、ERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤を有効成分として含有する微小管作用剤のための抗腫瘍作用増強剤が提供される。

5 また、本発明によれば、微小管作用剤とERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤を、患者に同時に又は所定の時間間隔で別々に投与することを特徴とする腫瘍の処置方法が提供される。

さらに、本発明によれば、微小管作用剤の抗腫瘍作用を増強するためのERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤の使用法が提供される。

10 さらにまた、本発明によれば、微小管作用剤とERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤を組み合わせ使用することが記載された表示又は文書を包装材料上又は包装材料内に有することを特徴とする、微小管作用剤及び／又はERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤を含む医薬製品が提供される。

15 本発明において用いられる「微小管作用剤」とは、微小管系に作用して抗腫瘍作用を示す薬物を意味し、その作用部位によって、 β -チューブリンに結合する化合物と微小管結合蛋白に結合する化合物とに別けられ、更に β -チューブリンに結合する化合物は、結合することによりチューブリンの重合を阻害する化合物とそれとは反対にチューブリンの異常な重合を促進する化合物とに別けられる。具体的には、チューブリンの
20 重合を阻害する化合物としては、例えば、ドラスタチン10及びその類縁化合物、ビンクリスチン及びその類縁化合物、メイタンシン (maytansine) (THE MERCK INDEX 12th EDITION No.5800)、リゾキシシン (rhizoxin)、ホモプシン (phomopsin)、ユスチロキシシン (ustiloxin)、コンプレスタチン (combrestatin) 等を挙げることができる。また、チュ

ーブリンの重合を促進する化合物としては、例えば、パクリタキセル (paclitaxel) (THE MERCK INDEX 12th EDITION No. 7117)、ドセタキセル (docetaxel)、タキソテール、タクススピン (taxuspine) 等を挙げることができる。

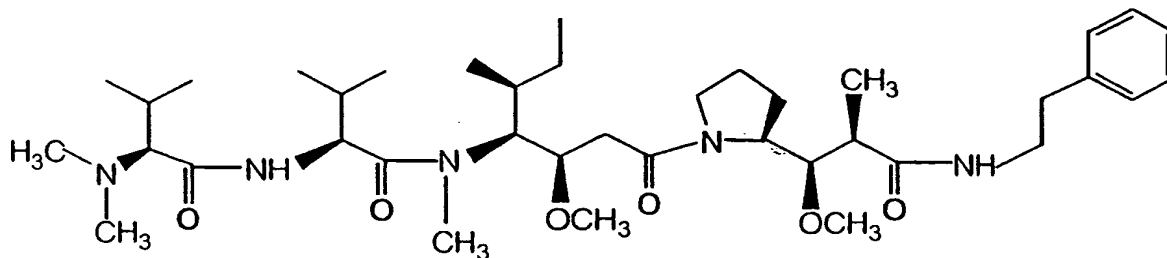
- 5 一方、微小管結合蛋白に結合する化合物としては、例えば、グリセオフルビン (THE MERCK INDEX 12th EDITION No. 4571)、エストラムスチン (THE MERCK INDEX 12th EDITION No. 3749) 等が挙げられる。

本発明において用いることができる微小管作用剤として好ましい化合物は、チューブリンの重合を阻害する作用を示す化合物であり、この中
10 でもとりわけドラスタチン 10 及びその類縁化合物並びにビンクリスチン及びその類縁化合物が好適に用いられる。

これらのドラスタチン 10 及びその類縁化合物の具体例としては、例えば、特開平 2-167278 号公報、国際公開 WO 93/03054 号パンフレット、国際公開 WO 95/09864 号パンフレット、国際
15 公開 WO 96/33212 号パンフレット、特開平 6-293795 号公報、特開平 7-70173 号公報、特開平 8-59693 号公報、特開平 8-81493 号公報、特開平 8-119990 号公報、特開平 8-188594 号公報、特開平 9-77791 号公報、特表平 7-506580 号公報、特表平 8-504415 号公報等の文献に記載されて
20 いるものが挙げられる。

このドラスタチン 10 及びその類縁化合物の中で、特に好適な化合物として下記の化合物 (以下「TZT-1027」という) を挙げることができる。

N^2 - (N, N-ジメチル-L-バリル) - N - [(1S, 2R) - 2-
 メトキシ-4 - [(2S) - 2 - [(1R, 2R) - 1-メトキシ-
 2-メチル-3-オキソ-3 - [(2-フェニルエチル) アミノ] プロ
 ピル] - 1-ピロリジニル] - 1 - [(S) - 1-メチルプロピル] -
 5 4-オキソブチル] - N-メチル-L-バリナミド



10

[TZT-1027]

また、ビンクリスチン及びその類縁化合物の具体例としては、例えば、
 ビンクリスチン (THE MERCK INDEX 12th EDITION No.10124)、ビンブ
 ラスチン (THE MERCK INDEX 12th EDITION No.10119)、ビンデシン (T
 HE MERCK INDEX 12th EDITION No.10125) 等を挙げることができる。

15

本発明において用いられる「ERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤」
 とは、ERK・MAPキナーゼカスケードの特定の分子に作用して最終的にM
 A Pキナーゼの作用が有効に発揮されないようにする化合物を意味し、
 理論的には、M A P K K Kの作用を阻害して活性型のM A Pキナーゼキ
 ナーゼが有効に生成されないようにする化合物、活性型M A Pキナーゼ
 20 キナーゼの作用を阻害して活性型のM A Pキナーゼが有効に生成されな
 いようにする化合物、又は活性型M A Pキナーゼの作用を阻害する化合
 物の全てが含まれる。

これらのERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤の具体例としては、例え
 ば、2 - (2-アミノ-3-メトキシフェニル) - 4H-クロメン-4

ーオン（以下「PD98059」という。Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 92, pp. 7686-7689, 1995）、1, 4-ジアミノ-2, 3-ジシアノ-1, 4-ビス（2-アミノフェニルチオ）ブタジエン（以下「U1026」という。J. Biol. Chem., Vol. 273, pp. 18623-18632, 1998）、
5 2-（2-クロロ-4-ヨードフェニルアミノ）-N-シクロプロピル
メトキシ-3, 4-ジフルオロベンズアミド（以下「PD184352
2」という。Nature Medicine, Vol. 5, pp. 810-816, 1999）等を挙げる
ことができる。

本発明において使用される微小管作用剤又はERK・MAPキナーゼカスケ
10 ード遮断剤は、必要に応じて、無機酸もしくは有機酸又は無機塩基もし
くは有機塩基と製薬学的に許容しうる塩を形成させて用いることができ
る。塩を形成させるのに用られる無機酸としては、例えば、塩酸、臭化
水素酸、硝酸、硫酸、リン酸等が挙げられ、有機酸としては、例えば、
酢酸、プロピオン酸、蔞酸、マロン酸、コハク酸、乳酸、リンゴ酸、酒
15 石酸、クエン酸、安息香酸、メタンスルホン酸等が挙げられる。一方、
塩を形成させるのに用いられる無機塩基としては、例えば、水酸化ナト
リウム、水酸化アンモニウム、炭酸カリウム、炭酸水素ナトリウム、水
酸化カルシウム等が挙げられ、有機塩基としては、例えば、メチルアミ
ン、ジエチルアミン、シクロヘキシルアミン、エタノールアミン、モル
20 ホリン等を挙げることができる。

上記の微小管作用剤及びERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤は、固体
形態（例えば、錠剤、硬カプセル剤、軟カプセル剤、顆粒剤、散剤、細
粒剤、丸剤、トローチ錠など）、半固体形態（例えば、坐剤、軟膏など）
又は液体形態（例えば、注射剤、乳剤、懸濁液、エリキシル剤、ローショ

ン、スプレーなど)のいずれかの製剤形態に調製して用いることができる。かかる製剤の製造の際に使用しうる添加物としては、例えば、でん粉、ブドウ糖、白糖、乳糖、果糖、マルトース、マンニット、ソルビット、シクロデキストリン、ケイ酸誘導体、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース又はその塩、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸マグネシウム、タルク、ステアリン酸マグネシウム、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、p-ヒドロキシ安息香酸アルキルエステル、セチルアルコール、シロップ、エタノール、プロピレングリコール、ワセリン、カーボワックス、グリセリン、塩化ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、クエン酸、乳酸、水酸化ナトリウム、ポリ乳酸、ポリ乳酸-グリコール酸等が挙げられる。

なお、上記製剤は、有効成分である微小管作用剤とERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤を一つの製剤中に両方とも含有する製剤として調製してもよく、また、微小管作用剤とERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤とをそれぞれ別々の製剤として調製することもできる。

本発明において、微小管作用剤とERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤は組み合わせて投与される限り、それらを同時に投与してもよく、又は所定の時間間隔で別々に投与することのいずれも可能であり、医師の判断や患者の症状等に応じて、これらの投与方法を適宜選択することができる。なお、別々に投与する場合は、一般にERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤を先に投与することが望ましい。

また、本発明において、微小管作用剤及び／又はERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤を含む医薬製品の包装材料上又は包装材料内には、微小

管作用剤とERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤の組み合わせに関するこれらの使用法が記載された表示又は文書が存在していることが好ましい。

本発明の製剤中における微小管作用剤及びERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤の含有量は、その剤形等に応じて変えることができるが、一般に、固体及び半固体形態の場合には0.1～50重量%の範囲内の濃度で、そして液体形態の場合には0.05～10重量%の範囲内の濃度で各薬剤を含有することが望ましい。

微小管作用剤及びERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤のそれぞれの投与量は、投与経路、症状の種類及びその軽重、医者の診断等により広範に変えることができるが、微小管作用剤については、一般に許容される有効な用量は約0.1～約1000mg/回であり、好適には約0.5～約500mg/回とすることができる。また、ERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤については、一般に許容される有効な一日用量は約0.1～1000mg/回であり、好適には約50～約500mg/回とすることができる。

しかし、上記の如く患者の症状の種類及びその軽重、医師の診断に応じて上記範囲の下限よりも少ない量又は上限よりも多い量を投与することはもちろん可能である。上記投与量の薬剤は数時間乃至1ヶ月に1回投与することができる。

20 実施例

以下、試験例及び実施例により本発明を更に具体的に説明する。

試験例

以下の試験において、微小管作用剤としてはTZT-1027又はビンクリスチンを用い、ERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤としてはPD

98059を用いた。

1. サンプルの調製

ヒト大腸癌細胞であるWiDr細胞(HSRRBより入手)を、直径6cmのプラスチック製培養皿中の10%ウシ胎仔血清を含むDMEM
5 培地に、 2.0×10^5 cells/3 mLとなるように播種し、5%CO₂下、37℃で48時間培養した。更に、1/1000容のPD98059(終濃度50 μmol/L)又は溶媒(DMSO)を添加して12時間培養した後、1/1000容のTZT-1027(終濃度10 nmol/L)又は溶媒(乳酸緩衝液)を添加した。なお、微小管作用剤として
10 ビンクリスチンを用いた場合は、1/1000容の硫酸ビンクリスチン(終濃度100 nmol/L)又は溶媒(DMSO)を添加した。TZT-1027又はビンクリスチン又は溶媒添加から24、48、72又は96時間後に、下記の方法により細胞を採取、処理した。なお、これらの96時間後に相当する溶媒コントロール及びPD98059単独
15 添加の細胞も同様に採取、処理した。

まず、培地を遠沈管に全て移した後、培養皿に0.05%トリプシン/リン酸緩衝化生理食塩液(PBS)-EDTA溶液1 mLを添加し、37℃で5分間インキュベートして浮遊させた細胞を先の培地に合わせ、1500 rpmで5分間遠心分離した。次いで、沈渣を1 mLのPBS
20 に再浮遊させて遮光マイクロチューブに移し、2500 rpmで5分間遠心分離し、沈渣を60 μLのPBSに懸濁した後、140 μLの100%エタノールを添加、攪拌して-20℃に一晩以上静置した。更に、2500 rpmで5分間遠心分離し、沈渣にリン酸-クエン酸緩衝液(0.2 M Na₂PO₄: 0.1 M クエン酸=24:1)を100 μL加

えて室温で30分間攪拌（500rpm）した。2500rpmで5分
間遠心分離し、沈渣に100μLのPBS及び1μLのRNase溶液
（10mg/mL（PBS）、SIGMA社より入手）を加え、37℃で
30分間インキュベートした。その後、880μLのPBS及び20μ
5 Lのヨウ化プロピジウム（以下「PI」という）溶液（1mg/mL（P
BS）、和光純薬工業より入手）を加え、室温で攪拌しながら30分間反
応させ、測定するまで暗所、氷冷下に静置した。

2. 死細胞率

死細胞率は、EPICS XLシステム（COULTER社製）を用いて測定解析し
10 た。解析を始めるにあたり、EPICS XLシステムのシステムチェックをD
Nacheck（COULTER社製）により行なった。

次に、DNA含量をパラメーターとして死細胞率を算出するために用い
るプロトコルの作成を行なうにあたり、そのプロトコル中でパラメ
ーターとしてFS（前方散乱光）、SS（側方散乱光）、FL3（PI
15 蛍光測定）を選定し、取り込み細胞数を30,000とした。更に、実際に測
定する細胞のコントロールサンプルを測定しながら各々のパラメーター
を考慮に入れて検出器の感度及び各領域の設定を行った。測定は、サン
プルを数回ピペッティングした後、フィルターを通して専用チューブに
移し、EPICS XL本体にセットして行った。死細胞も取り込んだデータ
20 からダブルット及びトリプレット等を除去したプロトコル中のヒスト
グラムにより死細胞率を算出した。その測定結果を下記表1に示す。

表 1

| ERK・MAPキナーゼ | | 時間 | 死細胞率(%) |
|--------------------|-------------------------|-----|---------|
| 微小管作用剤 | カスケード遮断剤 | | |
| なし(乳酸緩衝液) | なし(DMSO 0.1%) | 9 6 | 3. 0 |
| 5 なし(乳酸緩衝液) | PD98059(50 μ mol/L) | 9 6 | 8. 9 |
| TZT-1027(10nmol/L) | なし(溶媒のみで処理) | 2 4 | 3. 8 |
| | | 4 8 | 9. 2 |
| | | 9 6 | 23. 3 |
| TZT-1027(10nmol/L) | PD98059(50 μ mol/L) | 2 4 | 10. 5 |
| 10 | | 4 8 | 35. 9 |
| | | 9 6 | 48. 1 |
| ビンクリスチン(100nmol/L) | なし(溶媒のみで処理) | 2 4 | 4. 5 |
| | | 4 8 | 8. 4 |
| 15 | | 7 2 | 23. 3 |
| ビンクリスチン(100nmol/L) | PD98059(50 μ mol/L) | 2 4 | 12. 1 |
| | | 4 8 | 37. 4 |
| | | 7 2 | 58. 7 |

20 実施例 1

注射剤：

| | | mg / アンプル |
|------|-----------------|-----------|
| 主 薬 | T Z T - 1 0 2 7 | 0. 2 |
| 等張化剤 | 塩化ナトリウム | 適 量 |

| | | |
|--------|----------|-------|
| p H調整剤 | 乳酸 | 適 量 |
| p H調整剤 | 水酸化ナトリウム | 適 量 |
| 溶 剤 | 注射用水 | 適 量 |
| | | 1 m L |

5

注射用水に塩化ナトリウム及び乳酸を溶かし、その溶液に主薬を溶解する。水酸化ナトリウムでp Hを4～5に調整後、注射用水を加え、規定量にする。

10 錠剤：

| | m g / 錠 |
|-----------------------|-----------|
| P D 9 8 0 5 9 | 2 0 . 0 |
| でん粉 | 5 . 0 |
| 乳糖 | 1 3 2 . 0 |
| 15 カルボキシメチルセルロースカルシウム | 1 0 . 0 |
| タルク | 1 . 0 |
| ステアリン酸マグネシウム | 2 . 0 |
| | 1 7 0 . 0 |

20 P D 9 8 0 5 9を70ミクロン以下の粒度に粉碎し、それにでん粉、乳糖及びカルボキシメチルセルロースカルシウムを加えてよく混合する。10%のでん粉のりを上記混合粉体に加えて攪拌混合し、顆粒を製造する。乾燥後粒径を1000ミクロン前後に整粒し、これにタルク及びステアリン酸マグネシウムを混合し、打錠する。

請 求 の 範 囲

1. 微小管作用剤とERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤を、同時に又は所定の時間間隔で別々に投与して腫瘍を処置するための微小管作用剤とERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤の組み合わせ。
- 5 2. 微小管作用剤がチューブリン重合阻害剤である請求の範囲第1項記載の組み合わせ。
3. チューブリン重合阻害剤がドラスタチン10もしくはその類縁化合物又はビンクリスチンもしくはその類縁化合物である請求の範囲第2項記載の組み合わせ。
- 10 4. ERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤がMAPキナーゼ阻害剤、MAPキナーゼキナーゼ阻害剤又はMAPキナーゼキナーゼキナーゼ阻害剤である請求の範囲第1項記載の組み合わせ。
5. ERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤と組み合わせて使用するための微小管作用剤を有効成分として含有する抗腫瘍剤。
- 15 6. ERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤を有効成分として含有する微小管作用剤のための抗腫瘍作用増強剤。
7. 微小管作用剤とERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤を、患者に同時に又は所定の時間間隔で別々に投与することを特徴とする腫瘍の処置方法。
- 20 8. 微小管作用剤の抗腫瘍作用を増強するためのERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤の使用。
9. 微小管作用剤とERK・MAPキナーゼカスケード遮断剤を組み合わせて使用することが記載された表示又は文書を包装材料上又は包装材料内に有することを特徴とする、微小管作用剤及び／又はERK・MAPキナーゼカ

スケード遮断剤を含む医薬製品。

5

10

15

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00002

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ A61K45/00, 38/08, 35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ A61K45/00, 38/08, 35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1940-1992 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1996
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1992 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-1999

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN), REGISTRY (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| Y | Kazuto Nishio, "Tubulin and its Signal" (in Japanese), Cancer and Chemotherapy (Gan to kagaku ryoho), Vol.24, No.15 (1997), P.2213-2218, Full text, especially, P.2216, left column, line 9-19, (see EMBASE (STN Online), 1998066209) | 1-6, 9 |
| Y | Kazuto Nishio, "Enhanced Interaction between Tubulin and Microtubule-Associated Protein 2 via Inhibition of MAP Kinase and CDC2 Kinase by Paclitaxel" Int. J. Cancer, Vol.63, No.5 (1995), P.688-693 | 1-6, 9 |
| Y | Kazuya Fukuoka, "Microtubule Repressor" (in Japanese), Science and Chemotherapy, Vol.24, No.11 (1997), P.1519-1525 (see Chemical Abstracts, Vol.127, Abstract No.287461) | 1-6, 9 |
| Y | Yoichi Nakamura, "Molecular Target of Chemotherapy for anti-Lung Cancer" (in Japanese), New Medicine (Saishin Igaku), Vol.52, No.12 (1997), P.2700-2706 (see Chemical Abstracts, Vol.128, Abstract No. 29985) | 1-6, 9 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

Date of the actual completion of the international search
13 March, 2000 (13.03.00)

Date of mailing of the international search report
28 March, 2000 (28.03.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00002

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| Y | Townsend K. J. "Expression of the antiapoptotic MCL1 gene product is regulated by a mitogen activated protein kinase-mediated pathway triggered through microtubule disruption and protein kinase C", Oncogene, Vol.17, No.10 (1998) P.1223-1234 | 1-6,9 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00002

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 7,8
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The subject matter of claims 7 and 8 relates to a method for treatment of the human body by therapy, which does not require an international search report by the International Search Authority in accordance with PCT Article 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/00002

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K45/00, 38/08, 35/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K45/00, 38/08, 35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1940-1992年

日本国公開実用新案公報 1971-1992年

日本国登録実用新案公報 1994-1996年

日本国実用新案登録公報 1996-1999年

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), REGISTRY (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| Y | 西尾 和人「チューブリンとそのシグナル」癌と化学療法, Vol. 24, No. 15 (1997) P. 2213-2218, 全文, 特にP. 2216の左欄第9行~第19行 (EMBASE (STN Online), 1998066209参照) | 1-6, 9 |
| Y | Kazuto Nishio, "Enhanced Interaction between Tubulin and Microtubule-Associated Protein 2 via Inhibition of MAP Kinase and CDC2 Kinase by Paclitaxel" Int. J. Cancer, Vol. 63, No. 5 (1995) P. 688-693 | 1-6, 9 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 03. 00

国際調査報告の発送日

28.03.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田村 聖子

印

4 C

9 0 5 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| Y | 福岡 和也「微小管阻害剤」癌と化学療法, Vol. 24, No. 11(1997)P. 1519-1525(Chmical Abstracts, Vol. 127, Abstract番号287461参照) | 1-6, 9 |
| Y | 中村 洋一「肺がん化学療法の分子ターゲット」最新医学, Vol. 52, No. 12(1997)P. 2700-2706 (Chemical Abstracts, Vol. 128, Abstract番号 29985参照) | 1-6, 9 |
| Y | Townsend K. J. "Expression of the antiapoptotic MCL1 gene product is regulated by a mitogen activated protein kinase-mediated pathway triggered through microtubule disruption and protein kinase C", Oncogene, Vol. 17, No. 10(1998)P. 1223-1234 | 1-6, 9 |

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

- 請求の範囲 7 及び 8 は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 第 17 条 (2) (a) (i) 及び PCT 規則 39.1 (i V) の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって P C T 規則 6.4 (a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

